

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-515729
(P2001-515729A)

(43) 公表日 平成13年9月25日 (2001.9.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 P 37/06		C 1 2 P 37/06	4 B 0 3 3
C 1 2 N 11/08		C 1 2 N 11/08	4 B 0 6 4
C 1 2 P 13/00		C 1 2 P 13/00	
35/02		35/02	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2000-510883(P2000-510883)
(86) (22) 出願日 平成10年9月3日 (1998.9.3)
(85) 翻訳文提出日 平成12年3月1日 (2000.3.1)
(86) 国際出願番号 PCT/GB98/02645
(87) 国際公開番号 WO99/13098
(87) 国際公開日 平成11年3月18日 (1999.3.18)
(31) 優先権主張番号 9718740.5
(32) 優先日 平成9年9月5日 (1997.9.5)
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 アドバンスド・ファイトニックス・リミテッド
ADVANCED PHYTONICS LIMITED
イギリス、ダブリューエフ5・8エルティ、オセツト、ヒーリー・ロード、オルウェイ・ワークス
(72) 発明者 マジン・ニコラ
イギリス、ビーエヌ14・8キュービー、サセックス、ワーシング、レイトン・アベニュー27番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクタム化合物の製造におけるまたはそれに関する改良

(57) 【要約】

ラクトン、例えば6-アミノペニシラン酸 (6-APA) は、第1化合物、例えばペニシリン-G、水および非水性有機溶媒、特に1,1,1,2-テトラフルオロエタンを含有する溶媒混合物中で、酵素転化によって製造することができる。6-APAは析出され、濾過によって単離され、所望により誘導されて所望の化合物を生成する。酵素転化の副生成物、フェニル酢酸は、溶媒抽出、好ましくは1,1,1,2-テトラフルオロエタンも含有する溶媒を用いた抽出によって単離することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1化合物の触媒転化によって第2化合物を製造する方法であって、水および第1非水性溶媒からなる溶媒混合物中で、該第1化合物を触媒と接触させることからなる方法。

【請求項2】 該触媒が酵素である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 比較的高濃度の第2化合物が、転化をなす該酵素の酵素能を低下させる点で、該第2化合物に敏感である請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該酵素が脱アシル化反応を触媒することができる請求項2または請求項3に記載の方法。

【請求項5】 上記第1化合物が、一般式 R^1NHQ [式中、 R^1 は、所望により置換されたアルキルカルボニル基を示し、 Q は所望により置換された環式基を示す]である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 該溶媒混合物中の上記第1溶媒の重量と水の重量比が少なくとも2である請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 該溶媒混合物中の上記第1化合物と水の比 ($w/v\%$) が少なくとも10である請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 大気圧で、該第1非水性溶媒が80℃未満、-90℃よりも高い沸点を持つ請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 該第1溶媒が有機である請求項1～8に記載の方法。

【請求項10】 上記第1溶媒が $C_1 \sim C_4$ 所望により置換されたアルカンを含む請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 該第1溶媒がハロゲン化された請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 該第1溶媒が塩素化されていない請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 該第1溶媒がテトラフルオロエタンである請求項1～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 第2化合物を析出させ、次いで析出物の単離によって他の化合物/溶媒から第2化合物を単離する工程を含む請求項1～13のいずれかに

記載の方法。

【請求項15】 反応の副生成物が、溶媒混合物の非混和性上記第2溶媒相中に実質的に溶解する一方、第2化合物が溶媒混合物の水相中に実質的に溶解する値に、第2溶媒の存在下でpH値を調整することを含む請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 式 R^1COOH またはその塩の第3化合物ならびに第2および第3化合物を別々に分離することを含む方法。

【請求項17】 上記第1化合物が、ペニシリン発酵液に前駆体を添加することによって製造された天然ペニシリンまたは生合成ペニシリンまたはセファロsporinであり、そして上記第2化合物が6-アミノペニシラン酸または7-アミノデサセトキシセファロsporin酸である請求項1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 第3化合物、例えば酸または酸の塩、特にフェニル酢酸を含有する物質から第3化合物を取り出す方法である請求項1～13に記載の方法であって、以下を含む方法：

- a) 物質を溶媒と接触させて、溶媒に該第3化合物を取り込ませ、
- b) この取り込ませた溶媒を物質の残りから分離する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、化合物、特に活性な医薬化合物の製造に関する。本発明はラクタム、例えばペニシリンおよびセファロスポリンおよび／またはそれらの誘導体の製造に関するものであるが、特にこれに限定されない。

【0002】

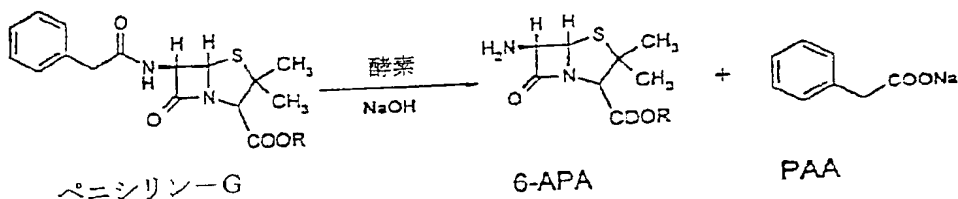
6-アミノペニシラン酸 (6-APA) および7-アミノデサセトキシセファロスポラニン酸 (7-ADCA) は、大半の半合成 β -ラクタム抗生物質の製造に使用される中間体である。6-APAの製造のために商業的に好ましい方法は、広くPen-Gとして知られているベンジルペニシリンの生化学的な脱アシル化、または同等の、広くPen-Vとして知られているフェノキシメチルペニシリンの酵素による脱アシル化を用いる。これは、不溶性マトリックス、例えばポリスチレンまたはポリアクリレートポリマーまたはコポリマーに固定されている酵素 (例えばペニシリンアシラーゼ) を用いて達成される。

【0003】

この技術を用いる様々な方法が、科学文献中で示されている。そのような方法において、ペニシリン-Gは、既知の手段を用いて発酵液から固体中間体として単離され、次いで比較的濃度の薄い溶液 (例えば、5 w/v %) で水に溶解される。酵素反応 (以下の式1で示され、式中のRはカリウムまたはナトリウムイオンである) は、高温 (例えば、35~40℃) で実施される。生成したフェニル酢酸 (PAA) は、濃度の薄い水酸化ナトリウム (例えば、5 w/v %) 水溶液の連続添加によって中和され、約8.0のpHが維持される。6-APAの単離は、通常、収率を最大にするために酵素反応液を、例えば6-APAに関して15%まで濃縮し、次いで濃度の薄い無機酸、例えば5%の硝酸または硫酸を用いて析出させることによって実施される。PAAは、非混和性の有機溶媒 (例えば、メチルイソブチルケトンまたはブチル酢酸) へ抽出することによって取り出される。最終的に、6-APAは、濾過によって取り出され、アセトンで洗浄され、次いで真空下で乾燥される。許容できる標準的な転化収率は、上記の脱アシル化方法に関して94~96%であって、析出および単離段階に関して82~86%である。

【化1】

式 1



【0004】

上記の方法で使用した固定化酵素は、生成物阻害に敏感なことがある。そのため、この反応は、通常、比較的濃度の薄い溶液で実施される。この欠点は、水への6-APAの溶解度が約2%であることで、これは母液中の生成物損失を最小にするために濃縮工程が必要であることを意味する。そのため、6-APA含量を12～16%に増加させるためにコストのかかる濃縮工程が適用されることが多い。

【0005】

PAAは、通常、ペニシリンーGの発酵において使用される成分の一つを構成する。そのため、それを再利用することができるよう反応廃棄物からPAAを回収することは工業的に有利である。工業的にPAAを回収するために使用される従来の方法は、以下の技術：減圧蒸留、精製（例えば、炭素処理）、水相への抽出、クロマトグラフィー、析出、濾過および乾燥、の2またはそれ以上の組合せを含む多段階法を用いる。これらの技術は、比較的費用がかかり、環境的な問題を含んでいる。

【0006】

本発明の目的は、上記の課題を解決することである。

【0007】

本発明の第1の態様によれば、第1化合物の触媒転化によって第2化合物を製造する方法であって、上記第1化合物および触媒を水と第1非水性溶媒を含む溶媒混合物中で接触させる方法が提供される。

【0008】

別途記載されず、または別途要求されなければ、明細書中に挙げた全ての化合物に関する引用は、化合物の塩に関する引用を包含する。

【0009】

上記触媒は酵素であるのが好ましい。該酵素は、例えば比較的高濃度の上記第2化合物が転化をなす該酵素能を低下させうる（「生成物阻害」として知られる効果）という意味において、該第2化合物に敏感であるかもしれない。

【0010】

該酵素は、脱アシル化反応を触媒することができるのが好ましい。これは、全てのペニシリンアシラーゼ産生微生物、例えば、エシェリキア (*Escherichia*)、特にエシェリキア・コリ (*Escherichia Coli*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、プロテウス (*Proteus*) およびマイクロコッカス (*Micrococcus*) から産生され得るアシラーゼを包含するのが適当である。該酵素は、物理的な吸収または固体、不溶性マトリックスへの結合によって適切に固定化されるのが好ましい。

【0011】

上記の第1化合物は、一般式 R^1NHQ [式中、 R^1 は所望により置換されたアルキルカルボニル基であり、 Q は所望により置換された環式基、特に所望により置換されたラクタム、例えば β -ラクタム基である] が好ましい。

【0012】

別途記載がなければ、所望により置換されたアルキル基は、12個まで、好ましくは8個まで、より好ましくは6個まで、特別には4個までの炭素原子を持っていてよい。該アルキル基の所望の置換基は、所望により置換されたアリール、アルケニル、アルキニル、アシル、ニトロ、シアノ、アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アルキルアミノ、スルフィニル、アルキルスルフィニル、スルホニル、アルキルスルホニル、スルホネート、アミド、アルキルアミド、アルコキシカルボニル、ハロカルボニルおよびハロアルキル基およびハロゲン、特にフッ素、塩素または臭素原子を包含する。

【0013】

該アルキルカルボニル基の好ましい所望の置換基は、所望により置換された、特別には置換されていないフェニル、カルボキシルおよびアミノ基を包含する。

【0014】

好ましい態様において、上記の基 R^1 は、所望により置換されたベンジルカルボニル基または $C(COOH)(NH_2)HCH_2CH_2CH_2C(O)$ またはそれらの塩であってよい。

【0015】

該基Qは、5または6員環であってよい別の所望により置換された環式基と結合したラクタムを包含することができる。

【0016】

上記の第1化合物は、天然の生成物、特に発酵反応の生成物またはその誘導体であってよい。該第1化合物は、抗生物質であるのが好ましい。第1の態様の方法は、生化学的な、特に発酵方法によって該第1化合物を製造する工程を包含することができる。

【0017】

該溶媒混合物中の該第1溶媒の重量と水の重量の比は、少なくとも2、好ましくは少なくとも5、より好ましくは少なくとも7、特に少なくとも10であってよい。ある場合において、少なくとも15または20であってよい。この比は、100未満であって、好ましくは50未満、より好ましくは30未満、特に20または20未満であってよい。記載した比は、転化反応中にどの時点でも存在するのが適当であるが、好ましくは反応開始時の比を示す。

【0018】

該混合物中に存在する上記第1化合物と水の比(w/v%として)は、少なくとも10、好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも30、さらに好ましくは少なくとも40、特に50またはそれ以上であってよい。この比は、100未満、好ましくは90以下、より好ましくは80または80未満であってよい。記載した比は、転化反応中にどの時点でも存在するのが適当であるが、好ましくは反応開始時の比を示す。

【0019】

該第1非水性溶媒は、大気圧で、80℃未満、好ましくは60℃未満、より好ましくは40℃未満、さらに好ましくは20℃未満の沸点を持っていてよい。特に好ましい溶媒は、0℃未満、好ましくは-10℃未満の沸点を持つ。沸点は、-90℃以上、好ましくは-70℃以上、より好ましくは-50℃以上であってよい。

【0020】

上記第1溶媒は、有機が好ましい。その溶媒は、芳香族であってもよいが、好ましくは脂肪族である。それは、10個未満、好ましくは8個未満、より好ましくは6個未満、より好ましくは4個未満、特に2個または2個未満の炭素原子を包含する。それは、所望により置換されたアルカン、アルケンまたはアルキンであってよい。C₁~C₄の所望により置換されたアルカンが好ましい。それは、ハロゲン化されているのが好ましい。好ましくは10個未満、好ましくは8個未満、より好ましくは6個未満、さらに好ましくは5個未満、特に4個または4個未満のハロゲン原子を包含する。好ましいハロゲン原子は、フッ素、塩素および臭素原子を包含し、フッ素、塩素が好ましく、フッ素原子が特に好ましい。

【0021】

該第1溶媒は塩素化されていないものが好ましい。この溶媒は、1個または1個以上の炭素、フッ素および水素原子のみからなるのが好ましい。

【0022】

該第1溶媒は、テトラフルオロエタンであるのが好ましく、1,1,1,2-テトラフルオロエタンが特に好ましい。

【0023】

該溶媒混合物は、他の溶媒を含んでよい。

【0024】

該第2化合物、特に遊離酸形態のとき（即ち、塩でないとき）、少なくとも0.1%、好ましくは少なくとも0.5%、より好ましくは少なくとも1.0%、さらに好ましくは少なくとも1.5%、特別には約2%水に溶解得る。該溶解度は、5℃で測定するのが好ましい。

【0025】

塩（例えばアルカリ金属塩）の形態の該第2化合物は、少なくとも5 w/v %、好ましくは少なくとも10 w/v %、より好ましくは少なくとも15 w/v %の水への溶解度を有し得る。

【0026】

該方法は、転化反応中、反応混合物のpHを調整する工程を包含するのが好ましく、生理学的に許容できるpH範囲内でpHを維持するのが適当である。このpHは、7～9の範囲にあるのが好ましく、より好ましくは7.8～8.2の範囲である。

【0027】

第1の態様において、この方法は、第2化合物を他の化合物/溶媒から単離することを包含してよい。単離は、第2化合物を析出させ、次いで濾過によって析出物を単離することを包含することができる。析出は、該第2化合物のpKa値で、またはpKa値付近にpHを調整することによって生じる。適当なpHは、5未満、好ましくは4未満であってよい。適当なpHは、2.5以上、好ましくは3.5以上であってよい。好適には、実質的に不溶性の形態の第2化合物を生成する。pHは、酸の水溶液、例えば1Mまたは2Mの硝酸または好ましくは1Mまたは2Mの硫酸の添加によって調整し得る。濾過した該第2化合物を第2溶媒で洗浄してよい。第2溶媒の痕跡は、蒸発によって、濾過した生成物から実質的にまたは完全に取り除くことができる。

【0028】

本発明の第2の態様において、この方法は、該第2化合物が溶媒混合物の水相に溶解し一方、反応の副生成物が実質的に溶媒混合物の非混和性の該第2溶媒相に溶解する値にpHを調整することを包含することができる。好ましいpHは2.5未満、より好ましくは2未満であってよい。該pHは、好ましくは1またはそれ以上であってよい。該第2溶媒の溶液は静置および物理的な分離によって該第2化合物を含有する水相から分離され、そこで該第2化合物を含有する水性反応液が得られる。該反応液は、反応副生成物の汚染物質の痕跡を除去するために、該第2溶媒で洗浄される。該第2化合物を、適当な塩基を用いてpHを調整することによって該反応液から析出させ、実質的に不溶性形態の該第2化合物を生

成することができる。適当な塩基は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムまたはアンモニアの水溶液であってよい。pHは、好ましくは2.5以上、より好ましくは3.5以上に調整されてよい。このpHは、5以下であるのが適当であって、好ましくは4以下である。該第1または第2の態様の両方において、該第2化合物の収率は、低い温度、好ましくは2~10℃の間で攪拌することによって最大にすることができる。該第2化合物は、濾過、洗浄および乾燥によって単離することができる。

【0029】

記載の第1および第2の態様で使用する該第2溶媒は、好ましくは共溶媒と組合せた第1非水性溶媒を包含する。該共溶媒は、本明細書中に記載したタイプの他の第1溶媒を包含することができる。しかし、好ましくは、共溶媒は異なるタイプのものである。該共溶媒は、第1物質に対する溶媒の沸点および/または溶解特性に影響するように選択される。該共溶媒の沸点は、60℃未満、好ましくは30℃未満、より好ましくは15℃未満、特別には5℃未満であってよい。該共溶媒の沸点は、-90℃以上、好ましくは-70℃以上、より好ましくは-50℃以上であってよい。

【0030】

該第2溶媒は、主成分の該第1溶媒を、副成分の該共溶媒と組合せて含むのが好ましい。該第2溶媒の好ましくは少なくとも90重量%、より好ましくは少なくとも93重量%、特別には少なくとも97重量%が、該第1非水性溶媒、特にフッ化炭化水素によって構成される。この残りは、1またはそれ以上の上記の共溶媒により構成されるのが好ましい。

【0031】

該共溶媒は、炭化水素およびエーテルから選択してよい。好ましい炭化水素は、6個までの炭素原子を有する。これらは、脂環式であってもよいが、脂肪族であるのが好ましい。これらはアルカンであるのが好ましく、メタン、エタン、プロパンおよびブタンであるのが好ましい。好ましいエーテルは、ジアルキルエーテル、例えばC₁~C₄ジアルキルエーテルであり、ジメチルエーテルが特に好ましい。

【0032】

上記第2溶媒を用いる第2化合物の精製では、該第2化合物は、好ましくは上記のようにpHを調整することにより、析出物を生じ得る。

【0033】

第1の態様の方法において、触媒転化は、該第2化合物および第3化合物を製造しうる。例えば比較的高濃度の該第3化合物が、転化をなす酵素能を低下させ得るという意味で、この酵素は第3化合物に敏感であるかもしれない。上記第1化合物が一般式 R^1NHQ である場合、該第3化合物は、式 R^1COOH の化合物またはその塩を示すことができる。この場合には、該第2化合物は、式 H_2NQ の化合物またはその塩であってよい。第1の態様の方法は、第2および第3化合物を互いに分離する工程を包含してよい。この工程は、該第2および第3化合物（またはその塩）が異なる溶解度および／または異なる分配係数を持つ溶媒（記載の上記第1または第2溶媒であってよい）を供給することを包含し、この特性を利用して分離を行う。第2および第3化合物は、溶媒および水からなる混合物を使用して分離されてよい。

【0034】

上記第3化合物、特にその遊離酸は、分離のために使用される溶媒にかなり溶解するのが好ましい。

【0035】

該第2化合物単離の後に、それを誘導して、好適には抗生物質を生成することができる。

【0036】

上記第1化合物は、天然のペニシリン、またはペニシリン発酵液に前駆体を添加することによって生成される生合成ペニシリン、またはセファロスポリンであってよい。好ましい該第1化合物は、ペニシリンーG、ペニシリンーX（p-ヒドロキシフェニルペニシリン）、ペニシリンーV（フェノキシメチルペニシリン）およびセファロスポリンGから選択される。この第2化合物は、6-アミノペニシラン酸または7-アミノデサセトキシセファロスポラニン酸であるのが好ましい；ならびに上記第3化合物は、所望により置換された、特別には置換されて

いないフェニル酢酸であってよい。

【0037】

本発明の1つの態様において、不溶性マトリックスに固定されているペニシリンアシラーゼ酵素を、ジャケット付反応容器に充填し、次いで必要量の水およびペニシリン-Gを攪拌しながら添加する。次いで、反応容器を封止して、10ミリバールまたはそれ以下の圧力に達するように真空にする。第1溶媒を、反応混合物物に加える。水酸化ナトリウムの水溶液(2.5~20w/v%またはそれ以上の範囲)は、反応に導入され、7.0~9.0のpH範囲、特に約pH8.0に維持される。反応温度は、終始ほとんど一定のレベルで維持される。好ましい温度範囲は、20~50℃、より好ましくは30~40℃である。

【0038】

NaOH水溶液をさらに添加する必要のない一定のpH値により示される反応終了時に、反応液は反応容器の底部からインラインフィルターを通して第2ジャケット付容器(蒸発容器)に取り込まれる。即ち、固定化酵素は、回収され、水で洗浄されてさらに使用するために貯蔵される。

【0039】

透明な濾過溶液は、ジャケットに冷却剤を流すことによって冷却される。好ましい温度は、0~20℃、より好ましくは2~10℃である。無機酸の水溶液、例えば1~4M硝酸または1~4M硫酸は、3.5~4.0の範囲のpH、理想的にはpH3.8となるように、攪拌しながらゆっくりと添加される。この操作中、ナトリウム塩として存在するフェニル酢酸(PAA)は、第1溶媒中に溶解する遊離酸の形態に転化される。PAAが第1溶媒に抽出され、一方6-APA(遊離酸の形態)は析出し、懸濁液として存在する。この反応混合物を、さらに30分から1時間の間、一定のpHおよび温度を維持しながら攪拌してよい。

【0040】

取り込んだ反応混合物を蒸発容器の底部からインラインフィルターを経て反応容器に戻すことによって、6-APAを適切かつ簡単に単離することができる。所望により、フィルター要素、例えば金網フィルターまたはガラス焼結物を容器の底部の流出口に取り付けてよい。

【0041】

本発明の第2の態様によれば、化合物を含有する物質から、本明細書中に記載の第3化合物（好ましくは酸または酸の塩、特にPAA）を除去する方法であって、以下からなる方法が提供される：

(a)物質を溶媒（例えば、本明細中に記載の上記第1溶媒または特に上記第2溶媒）と接触させて、溶媒に該第3化合物を取り込ませ、そして

(b)取り込ませた溶媒を該物質の残りから分離する。

【0042】

この方法において、接触させた該第3化合物は、遊離の酸であるのが好ましい。

【0043】

この方法において、該第3化合物は、溶媒を蒸発させることによって単離することができる。

【0044】

全ての発明のあらゆる態様の特徴または本明細書中に記載したあらゆる態様は、全ての別発明のあらゆる態様または本明細書に記載したあらゆる特徴と組合せることができる。

【0045】

本発明の特別な態様を、例示として記載する。

【0046】

次の用語を、下記で使用する。

Pen-G：式1に示されるようなペニシリン-Gを示す

6-PAA：6-アミノペニシラン酸を示す

PAA：フェニル酢酸を示す

MIBK：メチルイソブチルケトンを示す

フィトソール：1,1,1,2-テトラフルオロエタンを示す

フィトソール D：ジメチルエーテル（10重量%）および1,1,1,2-テトラフルオロエタン（90重量%）の混合物を示す

【0047】

下記に示した全ての分析は、以下のようなHPLCを用いて実施した。

移動相：pH6.0の1：1メタノール／水溶液＋酢酸中の25mM酢酸アン

モ ニウム

カラム：3.9×300mmカラム、10ミクロンC18逆転相充填物

検出：230nm

注入：10μl

【0048】

文字「C」がついた実施例の番号は比較例である。

【0049】

【実施例】

実施例C1：6-APAを製造するための標準（既知）方法

(i) Pen-Gの酵素脱アシル化

水（480ml）およびペニシリン-G（30g）を37℃に設定した水浴中のビーカーに入れた。この混合物を、温度が37℃に安定するまでゆっくりと攪拌した。ポリマー樹脂マトリックス上のペニシリンアシラーゼを含む酵素樹脂（38g）を添加し、5%のNaOHによってpH8.0にした。定常状態に達するまで、pH8.0、37℃に維持しながら攪拌を続けた。これを約2時間行った。使用した5%NaOHの合計量は、通常約65mlであった。この酵素樹脂を焼結漏斗を通して濾過し、この樹脂を水で洗浄し、次の使用のために冷蔵庫内で貯蔵した。6-APAおよびPAAを含有する溶液を以下(ii)に記載のよう

(ii) 6-APAの単離

6-APAおよびPAAを含有する酵素化液体を4倍に濃縮し、次いで5℃に冷却して同体積のMIBKを添加した。2M硝酸をpH3.8に至るまで滴下した。pHは、1時間、pH3.8で維持し、この間に、6-APAの遊離酸を析出した。次いで、この析出物を濾過し、MIBK、次いでアセトンで洗浄し、乾燥した。

【0050】

実施例1：本発明の態様の一般的方法

以下の (iii) および (iv) の方法は、二者択一であって、両方法は、6-A PAを単離するために用いることができる。

(i) 装置

この方法を行うための装置は、反応容器および蒸発容器からなり、これら両方は、温度制御のための手段としてジャケットを備えている。さらに、両方の容器は、試薬添加ビュレットと、攪拌、温度およびpHを測定する手段を備える。両方の容器は、相互に、および真空ポンプとガス圧縮機とにつながっていて、反応流を1つの容器から別の容器に移動させることができ、使用した揮発溶媒（本明細書中に記載した）を、両方の容器および適当な溶媒貯蔵タンクへおよびそれらから移動させることができる。インラインフィルター、一方向バルブおよび圧力放出バルブを取り付けて、装置を簡易かつ安全に操作し得る。

(ii) Pen-Gの酵素脱アシル化

水(100ml)およびPen-G(40g)を反応容器に入れ、続いて酵素樹脂(50.6g)を入れた。容器を密封し、圧力10ミリバール以下に排気し、攪拌を開始した。フィトソールA(1-2kg)を入れ、温水をジャケットに流すことによって温度を37℃で安定化させた。定常状態に達するまで、試薬ビュレットから5%のNaOHを添加することによって、8.0のpH値を、維持した。通常、必要なNaOH溶液の合計量は、約90mlであった。

(iii) 6-APAの単離

6-APAおよびPAAを含有する酵素化液体を反応容器に再び入れた。フィトソールD(1-2kg)を入れ、攪拌を開始した。冷水をジャケットに流すことによって冷却を行った。試薬ビュレットから2M硝酸をpH3.8になるまでゆっくりと添加し、pH3.8を維持しながら、攪拌を1時間続けた。この間、6-APAの遊離酸が析出し、一方PAAがフィトソールDの溶液中に残存した。

反応混合物を、6-APA析出物を保持するインラインフィルターを経て蒸発容器に入れた。次いで、フィトソールDを、反応容器およびインラインフィルターを通して、30分間、再循環させ(6-APA生成物を洗浄するため)、その後フィトソールDの流れを貯蔵シリンダーに戻した。次いで、6-APA析出物をインラインフィルターから単離した。全フィトソールDを蒸発させたとき、残

存する水溶液は、油性懸濁液としてPAAを含有した。

(iv) 6-APA単離 (別法)

6-APAおよびPAAを含有する酵素化液体をフィトソールAまたはフィトソールDまたは1,1,1,2-テトラフルオロエタンおよび共溶媒、例えば、脂肪族アルコール、ケトンまたはエーテルからなる別の溶媒混合物と攪拌した。2・5以下のpHに達するまで、無機酸（例えば1-4 Mの硝酸または硫酸）をゆっくりと添加した。pHを1・5～2・0に調整するのが好ましい。酸添加中の温度を2～20℃の範囲内に下げた。混合物を放置することによって2つの非混和性層が分離し、溶媒中のPAA溶液を含有する下層を流出させた。6-APAを含有する上層を、6-APAの遊離酸が析出するpH3・8に達するまで、低温で攪拌しながら、塩基（例えばNaOHまたはKOH水溶液）の水溶液で処理した。析出した6-APAを濾過によって単離した。

(v) PAAの単離

工程 (iii) で生成したPAAの油性懸濁液を含有する水溶液をフィトソール溶媒中に抽出し、溶液中のPAAを含有する非混和性フィトソール層を水層から分離した。PAAの単離をフィトソールを蒸発させることによって達成した。代わりに、工程 (iv) の後に、単離したPAA溶液から溶媒を蒸留することによってPAAを単離することができる。

【0051】

実施例C2： 6-APAの製造

実施例C1の方法を実施し、別の試料と比較するための基準を作った。この方法においては、Pen-G (30 g) を固定化酵素と反応させて、最終生成物 (6-APA) を乾燥させ、検量し、HPLCを用いて検定した。

結果を以下に示す：

使用したPen-G重量 = 30・0 g

固定化酵素重量 = 38・0 g

使用した水の体積 = 480 ml

使用した5% NaOH体積 = 65 ml

生成した酵素化液体の体積 = 550 ml

(17)

酵素化液体の検定 = 6-APA として $31,100 \mu\text{g}/\text{ml}$

転化工程の収率 = 96%

生成した 6-APA 重量 = 13.23 g

PenG からの全収率 = 74%

【0052】

実施例 2

スラリーを、Pen-G (40 g)、水 (50 ml) およびフィトソール (2 kg) を含有する反応容器中で製造した。5% NaOH を 2 時間にわたって添加し、その間 pH を 8.0 で維持した。用いた NaOH 溶液の全体積は 85 ml であり、完全転化を示した。反応終了時に、酵素樹脂を濾去し、フィトソールを蒸発させて貯蔵タンクに戻した。

酵素化液体の体積 = 160 ml

酵素液体の検定 = $142,300 \mu\text{g}/\text{ml}$

生成した 6-APA の体積 = 22.76 g

転化収率 = 98.2%

【0053】

酵素化液体 (80 ml) を析出させて、6-APA を実施例 1 (iii) に記載の方法に従って単離した。

生成した 6-APA 重量 = 9.6 g

Pen-G からの全収率 = 84.4%

【0054】

得られた生成物は乾燥しており、追加の真空乾燥は必要ではなかった。

【0055】

実施例 C 3

実施例 2 の 6-APA の単離工程との直接的な比較を提供するために、2 番目の酵素化液体の 80 ml 部分を、MIBK を使用して析出させ、アセトンを用いて洗浄し、20 時間真空下で乾燥した。

生成した 6-APA 重量 = 9.45 g

単離工程収率 = 83.0%

【0056】

実施例3：PAA抽出に対するpHの効果

この実施例は、異なるpHの値で酵素化液体からPAAを抽出する際の、フィトソールDの有効性および選択性を評価するために実施した。

【0057】

酵素液体を、実施例C2からの酵素樹脂を使用して実施例1に記載のように製造した。

【0058】

液体試料(20ml)を、以下のように手持ち装置を使用して、種々のpH値でフィトソールD(40ml)を用いて抽出した：
この装置は、フィルター集合体を取り付けた100mlの目盛り付きガラスチューブ、およびニードル弁を取り付けたクランプリングからなる。物質または抽出されるべき溶液は、チューブに充填した。次いで、封止用Oリングを用いて、フィルターを組み立て、次いで締め込みの達成をクランプリンにより確実にした。フィトソール液体ガスを、ニードル弁を経由してエアゾールボンベからガラスチューブに導入した。このチューブの内容物を激しい振盪によって混合し、次いでチューブを反転させ、2層が分離するまで放置した。次いで、フィトソールを、水層を共放出しないようにニードル弁から蒸発器ビン中に放出した。結果を以下の表に示した。

pH	除去した6-APA (全体のw/w%)	除去したPAA (全体のw/w%)
8.0	0	0
6.5	0	< 2
5.3	0	6.5
3.8	< 1	> 99
1.4	< 1	> 99

【0059】

実施例4－酵素化収率に対するフィトソールAの存在効果

実験を行い、フィットソールAの存在の酵素化収率、すなわち（酵素化で生成した6-APA）-（理論上6-APA）に対する効果を評価した。実験において、Pen-G（30g）を、水（300ml）に溶解させ、実施例1に記載のよう

うに脱アシル化した。

使用した2.5%NaOHの体積=134ml

生成した酵素化液体の体積=450ml

酵素化液体の検定=6-APAとして、 $38,120\mu\text{g}/\text{ml}$

酵素化収率=理論値の98.2%

【0060】

収率が、フィットソールA（実施例4および実施例C2を比較）の存在下に増加することを示した。

【0061】

実施例5-さらに濃縮したPen-G溶液を使用する効果

この実験は、6-APAの析出および実施例1(iii)の単離工程の前にさらに濃縮する必要性を避ける観点から、さらに濃縮したPen-G溶液の転化を包含した。この実験において、Pen-G（30g）を水（150ml）に溶解し、フィットソールA（2kg）を使用し、方法を上記のように実施した。

酵素化液体の最終体積=350ml

酵素化液体の検定=6-APAとして $47,800\mu\text{g}/\text{ml}$

転化収率=96%

【0062】

酵素液体をフィットソールD（2kg）に添加し、1M硝酸を用いてpH3.8に酸性化することによって、6-APAを実施例1(iii)に記載のように単離した。

単離した6-APA生成物の重量=5.6g

【0063】

使用した酵素液体の濃度は、母液中の所望の6-APAの損失を最小にするために、できるだけ高いのが好ましいことが分かる。

【0064】

実施例6-PAAの単離

前に得た、油性懸濁液としてPAA（約14g）を含有する水性流出溶液（300ml）を反応容器に入れた。フィットソールDを容器に入れ、混合物を30分間攪拌した。2層を15分間放置することによって分離させ、次いで容器の底部流出口に取付けたのぞきガラスによって分離させた。

【0065】

次いで、フィットソールDを蒸発させ、貯蔵シリンダーに戻した。PAAを、容器からオフホワイトの結晶性固体として集めた。

回収したPAAの重量 = 14.2 g

【0066】

開始溶液のPAA含量を正確に決定することは困難であるが、理論値に近い収量が可能であることがわかった。

【0067】

実施例7-pH調整のための硫酸の使用

酵素反応を、Pen-G（40g）、酵素樹脂（61g）、水（50ml）、pH 8.0を維持するために5% NaOHを用い、37℃の温度で実施例1（ii）に一般的に記載したように実施した。

結果を以下に示す：

酵素液体体積 = 145 ml

濃度 = 13.2%（HPLCによって）

酵素化工程の収率 = 83%。

【0068】

フィットソール（2kg）およびイソプロパノール（30ml）を含有する溶媒混合物を使用して、一般的に実施例1（iii）に記載したように、析出および単離を行った。4℃でpH 3.8まで1M硫酸を添加することによって、6-APAを析出させた。

6-APAを白色固体として単離した

収量 = 14.8 g

HPLC分析は、PAAが非常に少ない痕跡量であることを示した。

【0069】

本発明の好ましい態様は、以下の利点を有することができる：

- 酵素反応を、従来以上に高いPen-G濃度を有する溶液で実施することができ、そのため費用がかかる可能性のある濃縮工程のための必要性を排除または減らすことができる。
- 迅速な反応および／または改善された収率を包含するより効率的な酵素反応を達成する。98%またはそれ以上の転化収率を示す。
- 酵素活性は、上記溶媒系によって損なわれない。
- 大量の有機溶媒の必要性を排除または減らし、そのため、そのような溶媒に関連する問題、例えば貯蔵、回収および廃棄前の排出物処理を排除する。
- フィットソールは、PAAの除去において良好な効率を示し、溶媒中の6-APAの溶解度は無視できる。
- 6-APAの析出中、共溶媒の使用によって結晶形態を操作することができる。これは、後処理において有利であり得る。
- 乾燥6-APAを直接生成し、さらに生成物を乾燥する必要はない。
- 全体として、この方法は、確立された工業的な方法以上に迅速かつ安価である。

【0070】

有利には、広義において本発明は、ペニシリンおよびセファロスポリン分解酵素に限定されず、アシラーゼ、アミダーゼ、プロテアーゼおよびエステラーゼを包含する他の関連酵素にも適する。

【0071】

本願に関連して本願明細書より前またはそれと同時に出版され、本願明細書と共に公開された全ての書類および文書に注意を向けるべきであり、このような書類および文書の全ての内容が本願明細書の一部を構成する。

【0072】

本願明細書(添付した請求の範囲、要約書および図面の全てを含む)中に開示した特徴の全て、および／または、そのように開示した全ての方法または過程の工程の全てを、任意の組合せで組合せることができる(このような特徴および／ま

たは工程の少なくとも一部が相互に排他的である組合せを除く)。

【0073】

本願明細書(添付した請求の範囲、要約書および図面の全てを含む)中に開示した特徴のそれぞれを、他に特記することがなければ、同一、等価または同等の目的で使用する別の特徴によって置換することができる。即ち、他に特記することがなければ、開示した特徴のそれぞれは、一般的な一連の等価または同等の特徴の一例であるにすぎない。

【0074】

本発明は、上記態様の細部に限定されるものではない。本発明は、本願明細書(添付した請求の範囲、要約書および図面の全てを含む)に開示した特徴のあらゆる新規な特徴またはあらゆる新規な特徴の組合せ、あるいは、そのように開示した全ての方法または過程の工程のあらゆる新規な工程またはあらゆる新規な工程の組合せを包含するものである。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 98/02645

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		C12P13/00 C12N11/08 C07C209/62	
IPC 6 C12P37/06 C12P35/02			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)			
IPC 6 C12P C12N C07C			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	MORI T ET AL: "TRANSGLYCOSYLATION IN A TWO-PHASE AQUEOUS-ORGANIC SYSTEM WITH CATALYSIS BY A LIPID-COATED BETA-D-GALACTOSIDASE" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 298, no. 1/02, 20 February 1997, pages 65-73, XP000643359 see the whole document	1,2, 8-10, 12	
X	K. MARTINEK ET AL.: "Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 658, 1981, pages 76-89, XP002086833 ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL see the whole document	1,2,8-12	
Y	—	1-5, 17	
-/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents:		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *A* document member of the same patent family	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		Date of mailing of the international search report 21/12/1998	
Date of the actual completion of the international search		Authorized officer	
4 December 1998		Hornig, H	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3010			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 98/02645

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	
X	G.M. LEGOY: "The kinetic behaviour of a two-enzyme system in biphasic media: coupling hydrolysis and lipoxygenation" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 1337, no. 2, 8 February 1997, pages 227-232, XP002086834 ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL see abstract	1,2,9,12
Y	WO 82 01563 A (MATTIASSON BO;ALBERTSSON PER AKE; HAEGERDAL BAERBEL) 13 May 1982 see page 3, line 17 - page 7, line 29 see page 13; example 3	1-5,17
Y	E. ANDERSSON AND B. HAHN-HÄGERDAL: "Bioconversion in aqueous two-phase system" ENZYME MICROB. TECHNOL., vol. 12, April 1990, pages 242-254, XP002086835 Butterworth Publishers, US see the whole document	1-5,17
X	E. BALDARO ET AL.: "Phenylacetyloxymethylene, a carboxyl protecting group removable with immobilized penicillin acylase, useful in benzyl penicillin chemistry" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 29, no. 36, 1988, pages 4623-4624, XP002086517 Pergamon Press plc, Great Britain see page 4623, line 26 - line 37	1-5, 8-10,12, 14,17
X	US 3 530 148 A (MIYAKE YASUHIKO ET AL) 22 September 1970 see the whole document	1,8-11
A	EP 0 138 338 A (AMERICAN HOME PROD) 24 April 1985 see the whole document	1-15,17, 18
A	EP 0 122 681 A (TNO) 24 October 1984 see the whole document.	1-15,17, 18
A	US 5 500 352 A (LOPEZ JORGE L) 19 March 1996 see the whole document	1-15,17, 18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/GB 95/02645

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J.M. GUISSAN ET AL.: "Industrial design of enzymatic processes catalysed by very active immobilized derivatives: utilization of diffusional limitations (gradients of PH) as a profitable tool in enzyme engineering" BIOTECHNOL. APPL. BIOCHEM., vol. 20, no. 3, December 1994, pages 357-369, XP002086518 Portland Press Ltd, GB see the whole document	1-15,17, 18
A	DE 19 07 365 A (AKTIEBOLAGET ASTRA, SÖDERTÄLJE (SCHWEDEN)) 11 September 1969 see the whole document	1-15,17, 18
A	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS SPA) 5 August 1992 see the whole document	1-15,17, 18
P,A	WO 97 35029 A (ANTIBIOTICOS SA ; OLIVER RUIZ MANUEL (ES); FRAILE YECORA NIEVES (ES) 25 September 1997 see the whole document	1-15,17, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB 95/02645

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 16
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
The formulation respectively definition of claim 16 is incomplete.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Internatl Application No	
Information on patent family members				PCT/GB 98/02645	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 8201563 A	13-05-1982	AU 7726981 A		21-05-1982	
		EP 0053146 A		27-10-1982	
		JP 57501610 T		09-09-1982	
US 3530148 A	22-09-1970	NONE			
EP 0138338 A	24-04-1985	GB 2145336 A,B		17-04-1985	
		IE 57588 B		13-01-1993	
		IN 159585 A		30-05-1987	
		JP 60056981 A		17-04-1985	
EP 0122681 A	24-10-1984	NL 8301373 A		16-11-1984	
		AT 24741 T		15-01-1987	
		DK 201484 A		20-10-1984	
		JP 59210891 A		29-11-1984	
US 5500352 A	19-03-1996	US 5521068 A		28-05-1996	
DE 1907365 A	11-09-1969	AT 300198 B		15-05-1972	
		AT 297218 B		15-02-1972	
		BE 727506 A		01-07-1969	
		CA 941769 A		12-02-1974	
		CH 523320 A		31-05-1972	
		CH 538540 A		15-08-1973	
		CS 155970 B		24-06-1974	
		DE 1966427 A		24-08-1972	
		DE 1966428 A		14-09-1972	
		DE 1933301 A		25-06-1970	
		DK 128421 B		29-04-1974	
		DK 130743 B		07-04-1975	
		DK 130531 B		03-03-1975	
		FI 47109 B		31-05-1973	
		FI 51102 B		30-06-1976	
		FR 2001977 A		03-10-1969	
		FR 2081316 A		03-12-1971	
		GB 1261711 A		26-01-1972	
		IE 32962 B		06-02-1974	
		JP 48033386 B		13-10-1973	
		NL 6902045 A,B		19-08-1969	
		SE 400291 B		20-03-1978	
		SE 352643 B		08-01-1973	
		SE 382990 B		23-02-1976	
		US 3622462 A		23-11-1971	
EP 0496993 A	05-08-1992	IT 1252308 B		08-06-1995	
		AT 137535 T		15-05-1996	
		CA 2058216 A		22-06-1992	
		DE 69119216 D		05-06-1996	
		DE 69119216 T		05-09-1996	
		ES 2086470 T		01-07-1996	
		IE 75201 B		27-08-1997	
		JP 5211890 A		24-08-1993	
		US 5424196 A		13-06-1995	
WO 9735029 A	25-09-1997	ES 2105989 A		16-10-1997	
		AU 2029697 A		10-10-1997	
		EP 0826776 A		04-03-1998	

フロントページの続き

(S1)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K
E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM
, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, D
K, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR
, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, L
V, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ
, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U
S, UZ, VN, YU, ZW

Fターム(参考) 4B033 NA01 NA26 NB33 ND02
4B064 AH16 CA21 CA35 CB05 CC03
CC06 CD12 CD21 DA02